

仪器分析

及其在分子生物学中的应用

第三册

科学出版社

内 容 简 介

本书介绍了近年来在生物学、医学中采用的一些较新的实验技术方法：同位素法、同位素放射自显术、超速离心分析法、凝胶过滤法、电泳法、蛋白质的聚丙烯酰胺凝胶电泳法和蛋白质的凝胶聚焦电泳法。其中有的方法介绍原理较多，有的方法对操作叙述较细，有的方法还介绍了应用实例，各有不同，以便于读者参考。

本书可供生物化学、生物物理学、分子生物学、生理科学及医药学等方面的研究工作者，以及有关院校师生参考。

仪 器 分 析 及其在分子生物学中的应用

第 三 册

刘培楠 梁植权 宋振玉 编
梁晓天 周同惠 金大勋

*

科学出版社出版

北京朝阳门内大街137号

中国科学院印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

1978年6月第一版 开本：850×1168 1/32

1978年6月第一次印刷 印张：11 1/8

印数：0001—11,400 字数：294,000

统一书号：13031·710

本社书号：1024·13—10

定价：1.65元

序 言

近年来,生物科学尤其是分子生物学有了很大的进展,这也是生物化学和生物物理学所取得的成就;因此除生物化学和生物物理学之外,在生理学、药理学、病理学、流行病学、病毒学、内科学等医学科学范畴,以及在微生物学、植物学、育种学、植物遗传学等农业科学都有分子水平的研究工作报道。在这个发展过程中,仪器的灵敏度和自动化也相应提高,技术方法的改进和推陈出新,使烦琐的操作得以简化,冗长的实验时间得以缩短,精微的含量测定得以实现。我国经过伟大的无产阶级文化大革命运动,在科学研究的各个领域里都取得了优异的成绩。为了迅速发展祖国科学事业,创造祖国的新医学、新药学,和发展农业生产,建设社会主义,根据毛主席关于“**我们必须打破常规,尽量采用先进技术**”的教导,我们汇集了一些必要的和较新的方法技术,编成《仪器分析及其在分子生物学中的应用》第三册,为1965年出版的《仪器分析及其在生理科学中的应用》两册的续编,以供有关科学工作者参考。

由于发挥不同技术方法的特点,本书各章的编写方式不强求一致,有一部分是广泛地介绍某项技术方法的发展和特点,以便读者根据自己的需要选定方法;有的除详尽介绍操作步骤外,并附有较多的具体实验资料和图片,以便于读者作为判断结果的参考;有的在方法原理的叙述上用了较多篇幅,以便读者对方法技术的要点能了解得更为清楚并对分析实验结果更易掌握;有的在方法技术上作了详尽的叙述,提出了注意事项,汇集各种数据,并以在某项工作中的应用为例进一步说明,以资启发推广应用;有的仅为介绍某一类物质的分析技术,叙述较为简单扼要。编写作者都是本着自己在实验中的经验,因而在某处可能叙述较为详细,而在另一

处则较为简要,或者仅涉及某项技术的一个方面,未能齐全.但是,这些点滴经验往往是在多次反复实验中取得的,可能对初次采用的读者有所帮助,可以节省探索的时间和精力.

对本书的内容和编写各方面的意见,希望读者来信指正.

编 者

1975 年 5 月

54.64

4:3(2)

目 录

序言	(iii)
20. 同位素法	王世真 (1)
21. 同位素放射自显术及其应用	薛社普 (72)
22. 超速离心分析法	程伊洪 王克勤 (138)
23. 凝胶过滤法及其在核酸研究中的应用	
.....	胡炳晨 王申五 (216)
24. 电泳法	梁植权 (269)
25. 蛋白质的聚丙烯酰胺凝胶电泳法	应启龙 (297)
26. 蛋白质的凝胶聚焦电泳法	应启龙 (330)
索引	(349)

1103416

• i •

20. 同 位 素 法

王 世 真

引言

基本原理

- 一、同位素法的根据
- 二、放射性同位素的优缺点
- 三、稳定性同位素和放射性同位素的比较
- 四、同位素实验中应注意的事项

方法

- 一、标记化合物的制备
- 二、示踪实验的设计
- 三、同位素的测量

四、放射自显影

五、同位素稀释法

六、饱和分析法

同位素在生命科学中的应用

- 一、组织成分的测定
- 二、物质在机体内的转移
- 三、物质的代谢转变

附图

参考文献

引 言

同位素法可以认为是显微镜发明以来生物学及医学科学历史上最大的成就之一。显微镜指示了细胞的存在及微生物形态的秘密,而示踪同位素使我们洞悉生物体细胞中新陈代谢变化的内幕。这个方法的应用解决了很多以前无法解决的问题,而且奠定了不少新的概念:例如,生物体内一切成分均处在流动和互相交换的状态;又如,二氧化碳过去被认为是代谢的一种最终产物,但是目前证明它能重新被利用,通过一系列循环反应可以再度合成糖元、脂肪或氨基酸。以上例子说明,同位素不仅丰富了人们原有的知识,也证明了辩证唯物主义中一切事物都是互相联系的,又是不断运动及不断变化的法则。由此看来,同位素法不仅仅是研究工具,且对于学术思想及自然宇宙观,也有很大的贡献。

基 本 原 理

一、同位素法的根据

生物细胞不能区别同一元素的各个同位素，而是一视同仁地对待它们。这是同位素法应用于生物化学的第一个基本根据。为了讨论方便，下面我们将某一元素在自然界存在最多的原子，称为普通原子；与其原子序数相同的不稳定同位素，称为放射性同位素；相应的非放射性稀有同位素，称为稳定性同位素。一般同位素实验中，先要用合成方法使被研究的物质分子内含有稳定性或放射性的同位素，作为标记；将此物质注入体内，再借测定同位素的方法，追踪此物质在体内变化的情况。由于放射性或稳定性同位素和普通原子在化学性质上的一致性，这些同位素和相应的普通原子一样，在运转过程中遵循同一途径穿过肠内膜，透入细胞膜，在体液内扩散或循环。再者，无论是在酶促进的合成或分解，及其它生物化学转变中，或是在废物的形成及排泄中，一般而论，普通原子和其同位素的遭遇也是相同的。

然而，同位素和普通原子在物理性质上不同，因之能够被测定。在追踪他们的途径时，放射性的原子由于放出射线而显示出它们的位置和数量。文献中常用“放射性指示剂”、“示踪物”或“标记原子”等名字来表示放射性同位素或含有同位素的物质。这些物质单位时间内产生的蜕变数和它们所含的放射性原子的数目成正比，蜕变速度不会受到任何化学或物理作用的影响。此外，大于正常含量的稀有稳定性同位素，也可以用作某一元素的标记；因为我们也有适当的方法去衡量元素重量的差别，从而测出各种同位素混合物中某种稳定性同位素的含量。稳定性同位素在自然界的存在量或丰度常以“原子%”表示之。在做同位素实验之前，须将较稀有同位素的含量提高，这种同位素的浓度以“百分超”来说明。“百分超”就是“过量原子%”的简称，它表示该同位素浓度超过其在自然界存在的数值。例如，“10 过量原子 %¹⁵N”指的是 10.37 %¹⁵N，

因为 ^{15}N 的正常含量是0.37%。总之，放射性及稳定性同位素的可测量性是同位素法的第二个基本根据。

同位素法的另一个基本根据是，稳定性同位素在自然界中是以恒定比例存在的。前面已经谈过，用作标记的稳定性同位素，是自然界中寻常存在较少的一种。例如，天然的碳含有 ^{12}C 及 ^{13}C 两种稳定性同位素，后者的存在量约为前者的1%，故 ^{13}C 可以作为标记的原子。氢和重氢，氮和重氮也一样。苯、脂肪、头发及其他含氢物质中，重氢与氢的比例和水中所含者完全相同。一般氨基酸，按其氮的组成来说，是两种不同分子的混合物，其中 ^{14}N 占99.63%， ^{15}N 占0.37%；或者说，每万个分子中有9963个是含有 ^{14}N 和37个是含有 ^{15}N 的。正是利用了这一自然规律，才有可能以超过正常量的稳定性同位素作为可靠的人工标记原子。文献中也可以找到一些材料，说明同位素在自然界的分布比例可能有所改变。例如， ^{39}K 与 ^{40}K 的比例一般都是14:1，唯有在大鼠肉瘤中，此比例比正常组织高7%。稳定性硫(^{34}S)、氧(^{18}O)及碳(^{13}C)等原子在某些自然样品中的分布也与寻常略有差异。不过，这种情况只是极个别的例子。

二、放射性同位素的优缺点

这里主要讨论放射性同位素应用在医学及生物学研究上的优缺点。

首先，同位素法的灵敏度非常之高。极微量的放射性物质就可以相当准确地被测出。最精确的化学分析能够测量1个微克上下的物质；但能够被检定出来的放射性物质，有时可以少到一亿分之一乃至千亿分之一微克。例如，一个微居里的放射性磷（每秒37,000次），约相当于 6×10^{10} 个 ^{32}P 原子，可是这些磷原子的重量不过一万亿分之一克左右。放射性测量仪器能够准确地定量测出0.001微居里或更小的放射性。可见同位素法比常用的化学分析方法要灵敏得多。当研究激素或痕量元素在体内的代谢过程时，不用同位素示踪法是很难获得正确的结果的。

第二,同位素示踪法符合生理条件。过去研究糖代谢或蛋白质代谢时,往往采用急性手术,将动物的肝脏或胰脏切除;或注射根皮苷、四氧嘧啶等毒性物质,然后进行实验。这些实验条件,显而易见,是和正常代谢情况很不相同的。同位素法则可在正常生理情况下,研究物质在整体动物所起的变化。例如,将以 ^{14}C 标记的氨基酸给予动物,便可以观察组织蛋白质或血浆蛋白生成的速率。同时放射性物质的用量可以少到生理剂量,即接近正常进食量,必要时,还可以使用示踪剂量,即少于正常进食量或正常体内存在量的剂量。这种示踪剂量(若干微居里)对于放射性测量仪器的定量分析已经足够,但在重量上实际极小,对体内原有元素在数量上的增添是微不足道的,不至扰乱或破坏体内生理过程的平衡状态。在使用大剂量的代谢物进行试验时,往往得到不符合客观实际的错误认识。过去甲状腺研究中由于所用剂量的差异而得到不同的结果,可以视为滥用过量代谢物的典型例子。甲状腺浓集碘离子的过程,可以很方便地用 ^{131}I 标记的碘离子来研究。但是,“药理剂量”和“生理剂量”的碘离子在体内的命运截然不同。在前一种情况下,血浆碘大量升高,反而阻止碘离子进入甲状腺。如给大鼠静脉注射1毫克的碘,一小时内甲状腺只能固定其中的5—10%。这种碘在甲状腺中停留不过几个小时,因为它不能转变为有机碘化合物。当只注入1微克以下的生理剂量时,在几分钟之内甲状腺切片的自显影谱便显示出放射性碘的存在,大部分的碘在1小时内浓集,而在8—12小时的过程中,所有的放射性碘几乎定量地固定于甲状腺,转变为有机碘化合物。此外,如从静脉注射1毫克的 ^{131}I -甲状腺素,则大部分甲状腺素由尿及粪中排出。而注射生理剂量时,可以证明尿及粪中的碘并不属于甲状腺分子。

第三,用同位素时,可以分辨体内原有分子和实验中新注入动物机体内的分子。倘使不用具有同位素标记的葡萄糖,我们让动物进食葡萄糖之后,就无法分清哪些分子是体内原有的血糖,和哪些是从体外摄入的。

第四,用放射性同位素时,往往不经过提取或提纯的手续,即

可测定组织内的标记物质。有时甚至可以在人或动物的体外检查体内放射性物质的踪迹。在需要提取时,还可以将定量的非放射性的同一化合物作为“载体”加到含有同位素化合物的混合物中,以便提纯的手续更易于进行,使数量少得难以用一般生物化学操作分离的标记产物提取出来,并加以鉴定。对于提取小量的放射性代谢物,纸层析法和柱层析法也可以采用,而且它们常比载体方法更为适宜。使用载体法时,研究者必须事先知道欲提取的特殊中间产物是否确实或可能存在。层析法中,并不需要这种知识。只要用不同混合溶剂系统地进行双向层析,就可以分离出来混合物中所有的主要成分。假定层析法分开的代谢物的比放射性相当高,那么,即使它们只有数百乃至数千分之一微克,也有可能加以鉴定,甚至测定出来。由此可以看出,应用放射性同位素之后,通过载体方法或层析方法,提取或提纯都比较容易完成。

第五,同位素的应用能够揭示其他方法在目前还不能发现的事实,从而得出新的正确的结论。同位素示踪方法阐明了许多科学上没有弄清楚的问题,有时甚至使长久以来已成定论的概念起了根本的变化。过去谁会想到化学上完全对称的柠檬酸对于酶竟是一种不对称的分子,而酶与其作用物的联系一定要通过三个接触点呢?又有谁会想到,胆固醇的每一个碳原子都从乙酸转变而来,并且乙酸的两个碳原子会有规律地交替出现于胆固醇分子之中?更不用说胆固醇生物合成中那么多中间环节的确定与证明了。这些和其它许多生动的例子充分说明同位素示踪法的威力,而且给人留下难忘的印象。

在这一章的第三部分,拟列举不同类型的例子,说明同位素示踪方法的突出成就。这里只简单介绍染色体中脱氧核糖核酸(DNA)的复制机制问题,作为一个例子,来表明同位素方法对生物学基础理论的发展的推动作用。我们都知道,细胞内的染色体主要是由DNA所组成,而DNA是以双链的形式存在着,此双链系由氢键联系在一起。遗传的物质基础和DNA的复制有密切的关系。很早就有人提出这样的假设:在细胞分裂时,DNA的复制

过程包括 DNA 双链分离而成为两条单链，以此二单链为模板合成了与它们相对应的新链，成为双链而完成了复制的过程。这种说法对不对呢？分子水平的微细变化如何检查呢？只在应用了同位素技术后，才有探讨这类问题的可能性。已经证明，胸腺嘧啶核苷是 DNA 的一个特异组分。如以氚标记的胸腺嘧啶核苷引入正在繁殖的细菌体内，这核苷就很快地参入了细菌细胞染色体内的 DNA 的双链中去。当细胞分裂时，氢键断开，放射自显影显示染色体的第一子代都是带有标记的，更确切地说，在第一子代的 DNA 的一个单链中是含有标记氚的。以后，经第二次分裂，发现只有半数的染色体含有标记，而其他半数是不含放射性的。可以看出，放

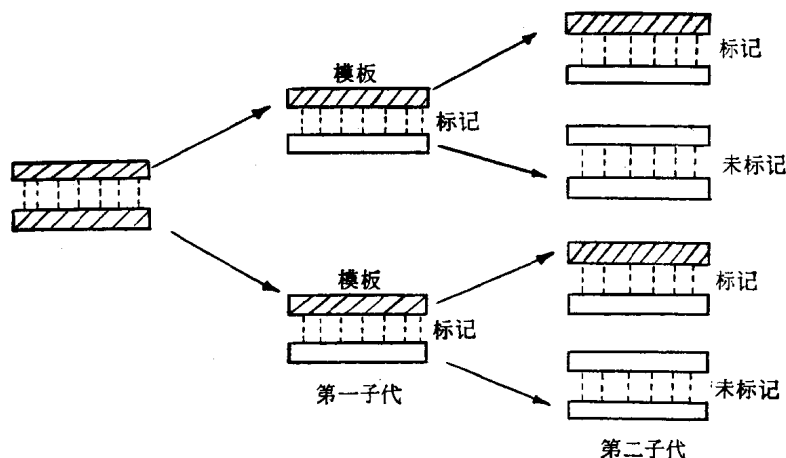


图 1' DNA 复制机制的示踪研究

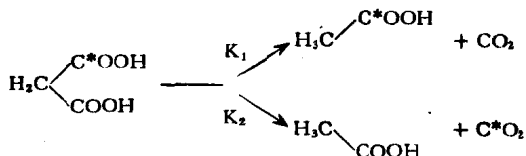
射自显影的结果完全支持了上述假设，为细胞内小得难以观察的变化提供了有意思的线索，对于研究遗传本质的关键性问题开辟了新的途径。

放射性同位素的应用虽然有上述这许多的优点，但在使用上也存在着一定的缺点和限制。目前放射性物质的来源不易，成本较一般药品为高，最常用的 ^{14}C 化合物尤其昂贵。工作人员必须有特殊的训练。测量仪器由复杂的电子学线路组成，其保管与维修经常需要物理技术干部的帮助。

有个别元素找不到合适的同位素。氟在自然界只以一种原子核存在，没有稳定性同位素可用；而其放射性同位素虽有三种，都衰变得非常之快，难以普遍推广应用。这是很遗憾的一件事，因为膳食内氟的代谢情况对于龋齿的预防有密切的关系，还需要进一步研究。

在示踪试验中，对于标记化合物内没有标记部分在生物体系中的命运，是无从断定的。例如，使用以碳标记的氨基酸时，虽能观察碳链转变的途径，却不能探讨氨基在体内的归宿。不过，这个限制是比较容易克服的。只须采用双标记或多标记的技术，我们可以任意标记被研究分子中对我们有兴趣的任一部位。有时这缺点也可以变成一个优点：注入放射性钠标记的氯化钠后，研究者可以专门追踪钠离子，而不必牵挂与其同时注入的氯离子的分布及其命运。

同位素的应用是以同位素与天然原子在化学及生物反应上的一致性为前提的。可是，有时同一元素的同位素之间由于质量的不同而显示出性质上的差异。这种情况，称为“同位素效应”，或“质量鉴别作用”。已经证明，重水渗透到红血球的速度比平常的水分子为慢。用重氢作实验，也发现标记琥珀酸被特殊脱氢酶氧化的速率与非标记者有所不同。氘和氢的差异，自然比氕要更大一些。其他同位素在质量上的差别比氢的同位素显然要小得多，不过这种差别仍可能对化学反应的速度略有影响。例如，在丙二酸的脱羧反应中， $K_1 > K_2$ （见下式），以致产品中二氧化碳的比放射性较反应物的比放射性显得小一些。不过，一般而论，在动植物界的复杂生化系统里，同位素效应并不产生任何明显的作用。



放射性元素最严重的缺点是和它们的放射性本身有关。如果放射性用量相当大时，一方面会损害工作人员的健康，另一方面又

会侵害实验生物,以致实验结果只反映着照射动物的反常代谢情况。因此,从事放射性工作的人员应当严格遵守实验规则,重视安全防护问题,同时应让所用电离辐射的剂量小到使得被观察的生物体系遭受的损伤可以忽略。

总起来说,应当认为同位素示踪法的优点是主要的,其缺点和限制相形之下比较少,而且大多数是可以克服的。

三、稳定性同位素和放射性同位素的比较

稳定性同位素在使用上一般说不如放射性同位素方便。从测量方面来看,稳定性同位素不但灵敏度不如放射性同位素高,而且探测也困难得多。稳定性同位素充其量只能稀释一万倍,否则不易测定。和放射性样品的制备相反,含有稳定性同位素的物质不易制成供测定用的样品。为了测定稳定性同位素,必须先将被测定的生物物质定量提出,并高度纯化。经精制过的样品还未必能直接用于同位素的测定。含氮的物质常须氧化成为氮水的形式,以便测量水样的密度。其他稳定性同位素也只有转变为气体或挥发性的液体之后,才适合于装到普通的质谱仪内,以进行同位素的分析。质谱仪是相当复杂的仪器,其价格远远超过一般放射性计数器,操纵技术也比测量放射性困难得多。除重氢以外,稳定性同位素每克价格也很昂贵。此外,从机体外部或组织内部直接检查稳定性同位素含量是不可能的。

可是稳定性同位素也有两个突出的优点。第一个是,它们没有损害组织的性能。重氢是唯一的例外,但它也只在浓度很高时才有阻碍细胞呼吸及酵解的作用。为安全计,示踪物中 ^2H 与 ^1H 的比例不宜超过1:5。稳定性同位素另一明显的优点即其稳定性。当我们进行一个长时间的示踪实验,或进行一个比较复杂的有机合成时,采用稳定性的同位素就较合适。

根据以上所述,对于同位素的选择,可以得到如下的结论:

- (1) 在一般情况下为方便计,尽可能优先采用放射性同位素。
- (2) 两种类型的同位素中,有时只有一种可用,那么显然就不

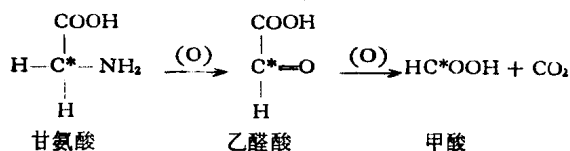
必考虑选择的问题。例如在生物学上有重要意义的元素中，氧和氮目前尚缺乏适用的放射性同位素；唯一可用者只有稳定性的 ^{18}O 及 ^{15}N 。至于 ^{15}O 的半衰期只有 1.97 分钟，而 ^{13}N 的半衰期也只有 10.1 分钟。反过来，碘在自然界只有一种原子核，其他的稳定性同位素并不存在；在同位素实验中，自然就不得不用放射性的碘了。

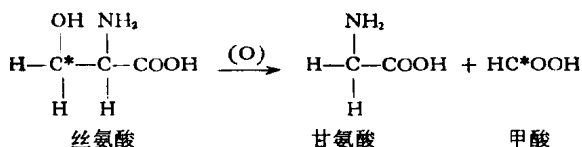
(3) 双标纪的实验中，同时使用放射性同位素和稳定性同位素，是比较方便的。

这里，值得补充说明一点：放射性同位素与稳定性同位素究竟哪一种更好，迄今不能轻易下结论。在三十年代，当人工放射性同位素还没有大量供应之际，生物化学家首先利用了稳定性同位素，研究体内成分的动态平衡，获得有历史意义的重要成果，奠定了同位素示踪应用的基础。不久前，C、H、O、N、S 等稳定性同位素的应用，重新受到重视。以 ^{13}C 为例，由于改进了生产方法，1970 年的售价比以前降低了一百倍，而丰度却提高了 50%；在测量技术方面，由于采用了核磁共振仪，既能对 ^{13}C 的标记物进行定性分析，又能提供较为灵敏的定量数据。随着生产数量的提高，价格不断降低；随着测定方法的完善，探测仪器的灵敏度不断提高，稳定性同位素的使用价值就会越来越大。目前已试用 ^{13}C 于糖尿病、某些心脏疾病和某些新生儿疾病的诊断，发挥了稳定性不会引起辐射损伤的优越性，出现了很好的苗头。也许有一天，稳定性同位素终将逐渐取代放射性同位素，而得到比现在更广泛得多的应用。

四、同位素实验中应注意的事项

(1) 所研究的化合物应当标记在适当的位置。举个例说，现在已经知道，甘氨酸和丝氨酸在体内都可以变成甲酸，其反应式如下：





由上式可见,甲酸系来自甘氨酸的 α 碳原子及丝氨酸的 β 碳原子。在实验中,如果标记恰巧放在上式带有*号的碳上,就可以得到标记的甲酸。倘使示踪物是用羧基上标记的甘氨酸和丝氨酸,便无从自同位素的测量查出甲酸的生成。

(2) 标记应当安插在化合物内稳定的位置。处在不稳定位置上的同位素,将于实验过程中,离开化合物,失去标记的作用。以氯标记的芥子气 $\text{S}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl}^*)_2$ 为例,这化合物遇到蛋白质时,即与氨基酸起反应而释放氯化氢。标记既然易于脱落,标记的分布情况,对于芥子气在体内的遭遇就无法追查。反之,有机化合物中的硫,如半胱氨酸,不和无机的硫氢基发生简单的交换。因此,放射性 ^{35}S 在代谢的研究中,可以用来标记含硫的氨基酸。连接于碳上的氮也同样不起交换作用,可是连接于碳上的氧较为活泼,易与水中的氧互相交换。分子碘或碘离子在酸性的溶液中都会与二碘酪氨酸发生交换作用;但在碱性反应中,此作用并不显著。极性基中的氢原子全不稳定。 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $=\text{NH}$ 等,很快就会与水溶液中的氢离子交换。位于羰基 α 位置的氢原子,及苯环上与羟基处于邻位或对位的氢原子,也都是不稳定的。但是连接于碳原子上的氢一般都十分稳定,即便在高温以强酸或强碱处理之,亦不脱落。

仔细的研究工作者往往先确定所使用的化合物是否会起简单的交换作用。例如,将 ^{32}P -磷酸钠与非活性的磷酸甘油、磷酸己糖、卵磷脂、酪蛋白或核酸混在一起若干时间,再用氧化镁混合剂沉淀磷酸盐。所有的放射性均在沉淀中,而自滤液中分出的有机化合物并没有任何放射性。这就证明了这些有机化合物的磷是稳定的。

值得注意的是,仅在试管中不起简单交换还不够,标记在体内

的脱落,也同样会模糊实验的结果。有人制得放射性磷酰胆碱,注射给实验动物,目的在于观察它会不会直接参入到组织磷脂分子中去,以便决定它是否是磷脂合成的中间产物。但是,可能是由于细胞膜表面上一些磷酸酶的作用,一切磷酸酯在进入细胞以前都被水解。为了这个缘故,所注入放射性的分布情况与普通无机磷酸盐完全无异,原来标记分子的命运竟没有可能追踪出来。

含放射性碳的物质,常被转变为碳酸钡的形式进行测定。此时,不要忘记样品中的 ^{14}C 可因与空气中二氧化碳的交换而显著损失,尤其在有湿气存在的情况。为避免这种损失,在过滤放射性碳酸钡时,应防止样品长期暴露于空气中,沉淀宜在真空中干燥。如可能,最好还要在无二氧化碳的干燥空气下,测定样品的放射性。

(3) 同位素的半衰期必须合适。生物科学研究中,所用放射性同位素的半衰期,多介乎 ^{14}C (20、35分钟)及 ^{14}C (5576年)二者的范围之内。衰变过速,则示踪性能只能短暂保持,实验操作时间受到限制。衰变过慢也不适宜,因为这些同位素的放射性常微弱至难于测量,而且也会持久在机体内引起放射损伤。半衰期在半天与100天之间的同位素是最方便的示踪工具。 ^{14}C 仅适用于极短的实验,因为在3.5小时的过程中,即约略相当于其半衰期10倍的时间内,其放射性强度几乎减低一千倍($2^{10} = 1024$)。虽然如此,巨大放射性强度的 ^{14}C 放射源是可以得到的;而且从体外探测标记碳化合物在体内的位置时, ^{14}C 仍然是碳的同位素中唯一可用的一种。近年来“快速合成”颇有进展,其目的就是把高放射强度的短半衰期同位素迅速引入到适用于示踪实验的特殊有机化合物中去。

在临床应用上,短半衰期同位素有许多突出的优点:(1) 比长寿命同位素在病人体内起作用的时间短,因而它给予病人的辐射剂量较小;(2) 可在同一病人身上重复地多次地使用;(3) 和长寿命同位素相比,如果受试者接受相同的总剂量,用短寿命同位素时,开始可以使用的放射性较大。这样得到较高的计数率,使得试验数据更为精确;以短寿命同位素作为体外显影试剂时,获得的图谱显得更为清晰。不少短半衰期同位素,可以由长寿命的放射性

同位素衰变而得到,亦即可以利用简便的同位素发生器而得到.应用发生器时,只须将装有长半衰期同位素的发生器运输到使用单位,然后就地以简单的化学抽取法把子体同位素从母体同位素中分离出来.这样,即使在离开同位素生产基地几千里外的地方,短半衰期同位素的应用也没有什么困难了.目前比较常用的同位素发生器有 ^{99}Mo — $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{113}Sn — $^{113\text{m}}\text{In}$ 、 ^{132}Te — $^{132\text{I}}$ 等.

(4) 所用的示踪物应当具有足够的放射性强度.应当注意到,放射性甘氨酸、乙酸、葡萄糖等最常见的代谢物,在体内或在实验过程中都会遇到大量的稀释.放射性的用量要使最后制成的样品仍有易于测出的放射性强度.若我们采用标记着 ^{14}C 的 CO_2 10 毫克作为实验材料,以研究葡萄糖被酵母所氧化时 CO_2 的去路问题.在实验时期,葡萄糖经发酵氧化,生成了 5,000 毫克左右的 CO_2 ,遂将原来加入的 $^{14}\text{CO}_2$ 大约稀释了五百倍.假设稀释前 $^{14}\text{CO}_2$ 的比放射性是每毫克每分钟 5,000 次;那么,实验之后,其比放射性变成每毫克每分钟 10 次.测定时共用样品 10 毫克,则其放射性为每分钟 100 次.这样的放射性是可以测量的.如果原来 $^{14}\text{CO}_2$ 所含的放射性较此例为低,就经不起稀释了.

(5) 放射性的强度也不宜过高,以免对研究者及研究对象发生损害作用.

检查示踪实验中有无放射效应,可以采用两种方法.第一种方法是用稳定性同位素作对照实验,而观察二者结果是否相同.例如,以 ^{13}C 代替 ^{14}C ,在完全相同情况下进行实验,便可查出有否因产生放射作用而引起代谢过程的异常情况.另一种方法,即重复进行同一实验,但逐步增加放射性同位素的浓度,由此测定那一种放射性水平足以产生与低示踪浓度不同的结果.

Jones 将五种 Na_2HPO_4 溶液分别注射给五组具有肿瘤的小鼠.这些溶液的 ^{31}P 含量相等,而 ^{32}P 含量不等.放射性由 1 渐增至 70 毫居里;最后一种剂量对小鼠而言,已属非常之高.可是,最大剂量的一组,在肝、肿瘤、血、脑、心等组织内 ^{32}P 的总回收量以及肝和肿瘤中磷脂 ^{32}P 的回收量与最小放射剂量组的结果都没有显著差